

(12) NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES  
PATENTWESENS (PCT) VERÖFFENTLICHTE INTERNATIONALE ANMELDUNG

(19) Weltorganisation für geistiges Eigentum  
Internationales Büro



(43) Internationales Veröffentlichungsdatum  
26. Februar 2004 (26.02.2004)

PCT

(10) Internationale Veröffentlichungsnummer  
**WO 2004/017070 A2**

(51) Internationale Patentklassifikation<sup>7</sup>: **G01N 33/543**

(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/DE2003/002452

(22) Internationales Anmeldedatum:  
21. Juli 2003 (21.07.2003)

(25) Einreichungssprache: Deutsch

(26) Veröffentlichungssprache: Deutsch

(30) Angaben zur Priorität:  
102 33 303.3 22. Juli 2002 (22.07.2002) DE

(71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten mit Ausnahme von  
US): MICRONAS HOLDING GMBH [DE/DE]; Hans-  
Bunte-Strasse 19, 79108 Freiburg (DE).

(71) Anmelder und

(72) Erfinder: KLAPPROTH, Holger [DE/DE]; Kehler-  
strasse 12, 79108 Freiburg (DE).

(74) Anwalt: STÜRKEN, Joachim; Joachim Stürken Paten-  
tanwalts-gesellschaft mbH, Engesserstrasse 4a, 79108  
Freiburg (DE).

(81) Bestimmungsstaaten (*national*): AE, AG, AL, AM, AT,  
AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR,  
CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE,  
GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR,  
KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK,  
MN, MW, MX, MZ, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT,  
RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SY, TJ, TM, TN, TR,  
TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.

(84) Bestimmungsstaaten (*regional*): ARIPO-Patent (GH,  
GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW),  
eurasisches Patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ,  
TM), europäisches Patent (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE,  
DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IT, LU, MC, NL,  
PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI-Patent (BF, BJ, CF, CG,  
CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Erklärung gemäß Regel 4.17:

— Erfindererklärung (Regel 4.17 Ziffer iv) nur für US

Veröffentlicht:

— ohne internationalen Recherchenbericht und erneut zu ver-  
öffentlichen nach Erhalt des Berichts

Zur Erklärung der Zweibuchstaben-Codes und der anderen Ab-  
kürzungen wird auf die Erklärungen ("Guidance Notes on Co-  
des and Abbreviations") am Anfang jeder regulären Ausgabe der  
PCT-Gazette verwiesen.

(54) Title: SENSOR SURFACE COMPRISING AN IMPROVED SIGNAL-NOISE RATIO

(54) Bezeichnung: SENSOROBERFLÄCHE MIT VERBESSERTEM SIGNAL/RAUSCH-VERHÄLTNIß

(57) Abstract: The invention relates to a sensor surface comprising an improved signal-noise ratio, based on a blocking reagent that is covalently immobilised on said sensor surface. The invention also relates to devices comprising surfaces of this type, in addition to methods that use the same.

(57) Zusammenfassung: Die Erfindung betrifft eine Sensoroberfläche mit verbessertem Signal/Rausch-Verhältnis auf der Basis von auf der Sensoroberfläche kovalent immobilisiertem Blochierungsreagenz sowie derartige Oberflächen umfassende Vorrichtungen und Verfahren unter Verwendung derselben.

WO 2004/017070 A2

**SENSOROBERFLÄCHE MIT VERBESSERTEM SIGNAL/RAUSCH-VERHÄLTNIS**

Die Erfindung betrifft eine Sensoroberfläche mit verbessertem Signal/Rausch-Verhältnis auf der Basis von auf der Sensor-  
5 oberfläche kovalent immobilisiertem Blockierungsreagenz sowie derartige Oberflächen umfassende Vorrichtungen und Verfahren unter Verwendung derselben.

Bei Sensoren, die nach dem Rezeptor/Liganden-Prinzip arbeiten, z.B. Antikörper/Antigen-Sensoren (Proteinsensoren), wird  
10 zumeist keiner der Reaktionspartner oder aber nur der Rezeptor kovalent immobilisiert. Nach dem Immobilisieren (Aufbringen) des Rezeptors wird meist vor der eigentlichen Reaktion ein Blockierungsreagenz oder -agens zugegeben, das verhindern  
15 soll, dass Analytmoleküle unspezifisch, d.h. nicht ausschließlich an den Rezeptor, an der Oberfläche des Sensors gebunden werden. Dieses Blockierungsreagenz belegt nicht genutzte Bereiche auf dem Sensor und ist für fast alle Messungen zwingend notwendig, um ein ausreichend hohes Sig-  
20 nal/Rausch-Verhältnis zu bekommen.

Ein bei Sensoren des Standes der Technik bisher stets auftretendes Problem ist, dass bei späteren Reaktions- und Wasch-  
25 schritten das Blockierungsreagenz entfernt wird. Eine Entfernung des Reagenzes führt zu einer (partiellen) Freilegung von Oberflächenbereichen auf dem Sensor, an denen dann wieder unspezifische Wechselwirkungen auftreten können. Eine solche Wechselwirkung oder Reaktion würde ein unspezifisches Signal bei der Detektion erzeugen, wodurch das Verhältnis von spezi-  
30 fischem Signal zu unspezifischem Signal deutlich verschlechtert würde.

Aufgabe der Erfindung ist, diesen den Sensoren des Standes der Technik anhaftenden Nachteil zu beseitigen.

Erfindungsgemäß wird diese Aufgabe gelöst durch die Bereitstellung einer Sensoroberfläche mit darauf kovalent immobilisierten spezifischen Sondenmolekülen für mindestens ein nachzuweisendes Biomolekül, bei der grundsätzlich für unspezifische Bindungen zur Verfügung stehende Stellen oder Bereiche der Sensoroberfläche durch mindestens ein kovalent daran immobilisiertes Blockierungsreagenz inaktiviert sind.

Kurz zusammengefasst werden also erfindungsgemäß Affinitätsensoren für Biomoleküle, die nach dem Rezeptor/Liganden-Prinzip arbeiten, nach dem Aufbringen der Rezeptormoleküle mit einem Reagenz behandelt, durch das unspezifische Interaktionen von Analytmolekülen außerhalb der für die spezifische Bindung an den bzw. die Rezeptor(en) vorgesehenen Bereiche der Sensoroberfläche durch kovalentes Binden eines sog. Blockierungsreagenzes oder -agens unterbunden werden. Dadurch wird das Signal/Rausch-Verhältnis der Reaktion verbessert und die Empfindlichkeit der Analyse erhöht. Kovalentes Immobilisieren bzw. Binden der Rezeptoren und der Blockierungsreagenzien auf der Sensoroberfläche erlaubt es, die Spezifität der Reaktion durch die Verwendung von z.B. hohen Tensidkonzentrationen zu erhöhen, weil während diverser Waschschritte, die stattfinden, um nicht gebundenen Analyt von dem Sensor zu entfernen, das Auswaschen der Blockierungsreagenzien verhindert wird.

Da das Signal/Rausch-Verhältnis bezüglich der Rezeptoren verbessert wird (d.h. nur das biologische Signal/Rausch-

Verhältnis nicht das elektronische Signal/Rausch-Verhältnis), wird auf diese Weise die absolute Sensitivität der Messungen erhöht und dadurch sowohl die Sensitivität des Sensors verbessert als auch die dynamische Breite der Messung deutlich erhöht. Insbesondere ergibt sich durch die Verwendung von lipophilen Photovernetzern bzw. »Photocrosslinkern« und amphiphilen Blockierungssubstanzen die Möglichkeit, Oberflächeneigenschaften gezielt zu verändern, und zwar ohne das Risiko, die wertvollen Rezeptorproteine zu beschädigen oder in sonstiger Weise zu beeinträchtigen. Auf diese Weise können z.B. Antikörperchips gegebenenfalls wiederverwendet werden, da der Aufbau und die Belegung des Chips im wesentlichen aufrecht erhalten bleiben.

Ein weiterer Aspekt der Erfindung betrifft ein Verfahren zur Verbesserung des Signal/Rausch-Verhältnisses von Biosensoren, bei dem eine erfindungsgemäße Sensoroberfläche verwendet wird. Daher betrifft die vorliegende Erfindung grundsätzlich alle Verfahren zum Nachweis des Vorhandenseins von Analyten in einer zu untersuchenden Probe unter Verwendung Oberflächen-gebundener Rezeptormoleküle, bei denen eine erfindungsgemäße Sensoroberfläche verwendet wird.

Ein weiterer Aspekt der Erfindung betrifft eine Vorrichtung zur Verwendung in einem erfindungsgemäßen Verfahren, die eine erfindungsgemäße Sensoroberfläche aufweist.

Ein weiterer Aspekt der Erfindung betrifft einen Kit zur Verwendung in einem erfindungsgemäßen Verfahren, der eine erfindungsgemäße Sensoroberfläche und gegebenenfalls Puffer und Nachweisreagenzien enthält.

Ein weiterer Aspekt der Erfindung betrifft ein Blockierungsreagenz, das mindestens eine photoreaktive Gruppe zur kovalenten Immobilisierung an einer Sondenoberfläche aufweist.

- 5 Ein weiterer Aspekt der Erfindung betrifft ein Verfahren zur Herstellung eines erfindungsgemäßen Blockierungsreagenzes, bei dem mindestens ein Blockierungsreagenz, wie oben definiert, mit mindestens einem Vernetzer umgesetzt wird, der mindestens eine photoreaktive Gruppe aufweist.

10

Ein weiterer Aspekt der Erfindung betrifft einen Kit zur Herstellung einer erfindungsgemäßen Sensoroberfläche, der mindestens ein erfindungsgemäßes Blockierungsreagenz der zuvor definierten Art und gegebenenfalls eine Sensoroberfläche sowie Puffer und Reagenzien enthält.

15

Weitere vorteilhafte und/oder bevorzugte Ausführungsformen der Erfindung sind Gegenstand der jeweiligen Unteransprüche.

- 20 Bei einer Ausführungsform der erfindungsgemäßen Sensoroberfläche bilden die Sonden- bzw. Rezeptormoleküle ein adressierbares Muster auf der Oberfläche. Derartige Muster sind aus der Bioarray- oder Biochip-Technik an sich bekannt und können mit beliebigen der dort angewendeten Techniken erzeugt werden, beispielsweise durch Aufdrucken. Die Array-Technik gestattet die parallele Untersuchung einer sehr großen Anzahl von Analyten.

25

- Zur Immobilisierung von Sondenmolekülen können beliebige Techniken angewendet werden, beispielsweise die von G. T. Hermanson in "Bioconjugate Techniques", Academic Press, 1996,

30

beschriebenen. Beispielsweise eignen sich im Falle von amino-terminierten Oligonukleotiden sogenannte reaktive Ester oder Reaktivester wie N-Hydroxysuccinimide (NHS-Ester), Epoxide, vorzugsweise Glycidyl-Derivate, Isothiocyanate, Isocyanate, 5 Azide, Carbonsäuregruppen oder Maleinimide. Selbstverständlich könnte auch mit den gleichen Photovernetzern immobilisiert werden, die weiter unten zur Immobilisierung der Blockierungsreagenzien beschrieben werden.

10 Bei einer weiteren Ausführungsform der erfindungsgemäßen Sensoroberfläche erfolgt die kovalente Immobilisierung des mindestens einen Blockierungsreagenzes über mindestens einen photoreaktiven Vernetzer oder »Crosslinker«. Es ist möglich, mehrere unterschiedliche Blockierungsreagenzien parallel zu 15 verwenden. Grundsätzlich ist jedes im Stand der Technik verwendete Blockierungsreagenz erfindungsgemäß geeignet. Jedes Blockierungsreagenz kann gegebenenfalls mit mehreren, auch unterschiedlichen, photoreaktiven Vernetzern immobilisiert werden.

20 Bei einer weiteren Ausführungsform der erfindungsgemäßen Sensoroberfläche weist der mindestens eine photoreaktive Vernetzer mindestens eine unter Benzophenon oder Derivaten davon, Anthrachinon oder Derivaten davon, Thymidin oder Derivaten 25 davon und 4-Azidobenzoessäure oder Derivaten davon ausgewählte photoreaktive Gruppe auf. Grundsätzlich ist jeder photoreaktive Vernetzer des Standes der Technik erfindungsgemäß geeignet.

30 Bei einer weiteren Ausführungsform der erfindungsgemäßen Sensoroberfläche ist die Sensoroberfläche unter Metall-, Halbme-

tall-, Halbmetalloxid-, Glas- oder Polymeroberflächen ausgewählt.

Bei einer weiteren Ausführungsform der erfindungsgemäßen Sensoroberfläche ist die Metalloberfläche unter Gold- und Aluminiumoberflächen ausgewählt.

Bei einer weiteren bevorzugten Ausführungsform der erfindungsgemäßen Sensoroberfläche ist die Halbmetalloberfläche eine Siliciumoberfläche.

Bei einer weiteren Ausführungsform der erfindungsgemäßen Sensoroberfläche ist die Halbmetalloxidoberfläche eine Siliciumoxid oder Aluminiumoxidoberfläche.

Bei einer weiteren Ausführungsform der erfindungsgemäßen Sensoroberfläche ist die Glasoberfläche eine Quarzglasoberfläche. Grundsätzlich ist jede bekannte Glasoberfläche erfindungsgemäß geeignet.

Grundsätzlich sind alle Oberflächenformen erfindungsgemäß geeignet. Obgleich die Oberfläche bei Biochip-Anwendungen zu meist im wesentlichen eben ist, liegt es für den Fachmann auf der Hand, dass auch Oberflächen mit Vertiefungen sowie solche, die nicht flach sondern rund bzw. sphärisch ausgestaltet sind, erfindungsgemäß gleichermaßen geeignet sind.

Bei einer weiteren Ausführungsform der erfindungsgemäßen Sensoroberfläche ist die Polymeroberfläche unter Oberflächen aus Cycloolefincopolymer oder Derivaten davon, Polystyrol oder Derivaten davon, Polyethylen oder Derivaten davon, Polypropy-

len oder Derivaten davon, Polyimid oder Derivaten davon und Polymethylmethacrylat oder Derivaten ausgewählt. Grundsätzlich ist jede bekannte Polymeroberfläche erfindungsgemäß geeignet. Hiervon umfasst sind auch Oberflächen, die quellbare  
5 oder wasserpermeable polymere oder copolymere Strukturen aufweisen und mono-, bi- oder polyfunktionalisierte Kopplungsgruppen umfassen können.

Ferner sind die im Stand der Technik für analytische oder  
10 diagnostische Zwecke bekannten Membranen wie insbesondere solche aus Nylon und Nitrocellulose geeignet.

Bei einer weiteren Ausführungsform der erfindungsgemäßen Sensoroberfläche ist das Sondenmolekül (Rezeptor) ein Partner  
15 eines spezifisch wechselwirkenden Systems von komplementären Bindungspartnern (Rezeptor/Ligand).

Bei einer weiteren Ausführungsform der erfindungsgemäßen Sensoroberfläche beruht das spezifisch wechselwirkende System  
20 von komplementären Bindungspartnern auf der Wechselwirkung einer Nukleinsäure mit einer komplementären Nukleinsäure, der Wechselwirkung einer Peptidnukleinsäure mit einer Nukleinsäure, der Enzym/Substrat-, Rezeptor/Effektor-, Lectin/Zucker-, Antikörper/Antigen-, Avidin/Biotin-, oder Streptavidin/Bio-  
25 tin-Wechselwirkung.

Bei einer weiteren Ausführungsform der erfindungsgemäßen Sensoroberfläche ist die Nukleinsäure eine DNA oder RNA oder ein Analogon davon.



Bei einer weiteren Ausführungsform der erfindungsgemäßen Sensoroberfläche ist die DNA oder RNA ein Oligonukleotid.

Bei einer weiteren Ausführungsform der erfindungsgemäßen Sensoroberfläche ist der Antikörper ein polyklonaler, monoklonaler, chimärer oder »Single-chain«-Antikörper oder ein funktionelles Fragment oder Derivat eines derartigen Antikörpers. Unter einem funktionellen Fragment oder Derivat eines Antikörpers wird hier jedes Fragment oder Derivat eines Antikörpers mit spezifischer Antigenbindungsfähigkeit verstanden. Diese kann sich in der Stärke von der des nativen Antikörpers unterscheiden, das Fragment oder Derivat muss dabei aber nicht notwendigerweise gleichzeitig auch immunisierende Wirkung im Körper haben.

Bei einer weiteren Ausführungsform der erfindungsgemäßen Sensoroberfläche ist das Blockierungsreagenz unter Casein, hydrolysiertem Casein, einem Tensid, Rinderserumalbumin, fötalem Kälberserum, Serum neugeborener Kälber, und Mischungen davon ausgewählt. Diese Blockierungsreagenzien sind im Handel erhältlich und beispielsweise über die Firma Sigma-Aldrich Chemie GmbH zu beziehen.

Bei einer weiteren Ausführungsform der erfindungsgemäßen Sensoroberfläche ist das Tensid unter Natriumpalmitat, Brij® 35, Brij® 58, Cetylpyridiniumchlorid-Monohydrat, Cetyltrimethylammoniumbromid, 3-(3-Cholamidopropyl)-dimethylammonio-1-propansulfonat, 3-(3-Cholamidopropyl)-dimethyl-ammonio-2-hydroxy-1-propansulfonat, Decan-1-sulfonsäure-Natriumsalz, N,N-Bis-[3-(D-gluconamido)-propyl]-deoxycholamid, Dodecan-1-sulfonsäure-Natriumsalz, Dodecyl- $\beta$ -D-maltosid, 6-O-(N-Heptyl-

carbamoyl)-methyl- $\alpha$ -D-glucopyranosid, Heptan-1-sulfonsäure-Natriumsalz, N-Lauroylsarcosin-Natriumsalz, Octanoyl-N-methylglucamid, N-Nonaoyl-N-methylglucamid, Natriumcholat, Natriumdeoxycholat, Nonan-1-sulfonsäure-Natriumsalz, Nonidet  
 5 P40, Octan-1-sulfonsäure-Natriumsalz, n-Octyl- $\beta$ -D-glucopyranosid, Pentan-1-sulfonsäure-Natriumsalz, n-Octyl- $\beta$ -D-thioglu-  
 copyranosid, Pluronic® F-68, Saccharosemonolaurat, Natriumdo-  
 decylsulfat, N-Dodecyl-dimethyl-3-ammonio-1-propansulfonat,  
 N-Tetradecyl-dimethyl-3-ammonio-1-propansulfonat, Triton® X-  
 10 100, und Mischungen davon ausgewählt. Diese Tenside sind im  
 Handel erhältlich und beispielsweise über die Firma Sigma-  
 Aldrich Chemie GmbH zu beziehen. Grundsätzlich sind alle be-  
 kannten Tenside erfindungsgemäß geeignet.

15 In der folgenden Tabelle werden weitere Details der obigen  
 Tenside angegeben.

Bezeichnung	Summenformel	Typ
Brij® 35	$C_{58}H_{118}O_{24}$	nichtionisch
Brij® 58	$C_{56}H_{114}O_{21}$	nichtionisch
Cetylpyridiniumchlorid-Monohydrat	$C_{21}H_{38}ClN \times H_2O$	kationisch
Cetyltrimethylammoniumbromid	$C_{19}H_{42}BrN$	kationisch
CHAPS	$C_{32}H_{58}N_2O_7S$	zwitterionisch
CHAPSO	$C_{32}H_{58}N_2O_8S$	zwitterionisch
Decan-1-sulfonsäure-Natriumsalz	$C_{10}H_{21}NaO_3S$	

Deoxy-BIGCHAP	$C_{42}H_{75}N_3O_{16}$	nichtionisch
Dodecan-1-sulfonsäure-Natriumsalz	$C_{12}H_{25}NaO_3S$	
Dodecyl- $\beta$ -D-maltosid	$C_{12}H_{25}NaO_3S$	nichtionisch
HECAMEG	$C_{15}H_{29}NO_7$	nichtionisch
Heptan-1-sulfonsäure-Natriumsalz	$C_7H_{15}NaO_3S \times H_2O$	
N-Lauroylsarcosin-Natriumsalz	$C_{15}H_{28}NNaO_3$	anionisch
MEGA-8	$C_{15}H_{31}NO_6$	nichtionisch
MEGA-9	$C_{16}H_{33}NO_6$	nichtionisch
Natriumcholat	$C_{24}H_{39}NaO_5$	anionisch
Natriumdeoxycholat	$C_{24}H_{39}NaO_4$	anionisch
Nonan-1-sulfonsäure-Natriumsalz	$C_9H_{19}NaO_3S$	
Nonidet P40	Mischung aus 15 Homologen	
Octan-1-sulfonsäure-Natriumsalz	$C_8H_{17}NaO_3S$	
n-Octyl- $\beta$ -D-glucopyranosid	$C_{14}H_{28}O_6$	nichtionisch
Pentan-1-sulfonsäure-Natriumsalz	$C_5H_{11}NaO_3S$	

n-Octyl- $\beta$ -D-thiogluco- pyranosid	$C_{14}H_{28}O_5S$	
Pluronic® F-68	n.a.	nichtionisch
Saccharosemonolaurat	$C_{24}H_{44}O_{12}$	nichtionisch
SDS (Natriumdodecylsul- fat	$C_{24}H_{44}O_{12}$	anionisch
Sulfobetain SB 12	$C_{17}H_{37}NO_3S$	zwitterionisch
Sulfobetain SB 14	$C_{19}H_{41}NO_3S$	zwitterionisch
Triton® X-100		nichtionisch
Triton® X-114	$C_{30}H_{54}O_9$	nichtionisch
Tween® 20		nichtionisch
Tween® 80		nichtionisch

Abkürzungen: CHAPS (3-(3-Cholamidopropyl)-dimethylammonio-1-propansulfo-  
nat); CHAPSO (3-(3-Cholamidopropyl)-dimethyl-ammonio-2-hydroxy-1-propan-  
sulfonat); Deoxy-BIGCHAP (N,N-Bis-[3-(D-gluconamido)-propyl]-deoxychol-  
amid); HECAMEG (6-O-(N-Heptylcarbamoyl)-methyl- $\alpha$ -D-glucopyranosid); MEGA-  
8 (Octanoyl-N-methylglucamid); MEGA-9 (N-Nonanoyl-N-methylglucamid); SDS  
(Natriumdodecylsulfat); Sulfobetain SB 12 (N-Dodecyl-dimethyl-3-ammonio-1-  
propansulfonat); Sulfobetain SB 14 (N-Tetradecyl-dimethyl-3-ammonio-1-  
propansulfonat).

Bei einer weiteren Ausführungsform des erfindungsgemäßen Blo-  
ckierungsreagenzes ist die mindestens eine photoreaktive  
Gruppe unter Benzophenon oder Derivaten davon, Anthrachinon

oder Derivaten davon, Thymidin oder Derivaten davon und 4-Azidobenzoessäure oder Derivaten davon ausgewählt.

Bei einer Ausführungsform des erfindungsgemäßen Verfahrens zur Herstellung des erfindungsgemäßen Blockierungsreagenzes wird die mindestens eine photoreaktive Gruppe unter Benzophenon oder Derivaten davon, Anthrachinon oder Derivaten davon, Thymidin oder Derivaten davon, und 4-Azidobenzoessäure oder Derivaten davon ausgewählt.

Die Erfindung wird im folgenden beispielhaft erläutert.

Eine geeignete Blockierungssubstanz, z.B. Casein für Polystyroloberflächen, wird mittels eines Vernetzers bzw. »Crosslinkers« mit einer photoreaktiven Gruppe versehen, z.B. 4-Azidobenzoessäure-N-hydroxy-succinimidester. Diese chemischen Gruppen erlauben es, nach der eigentlichen Blockierungsreaktion die Blockierungsreagenzien an den für sie zugänglichen Stellen kovalent zu immobilisieren. Wahlweise kann auch die Oberfläche mit photoreaktiven Gruppen versehen sein, z.B. Glas, das mit einem Benzophenonsilan beschichtet wurde. In diesem Falle kann mit dem nativen Blockierungsreagenz gearbeitet werden, und die Immobilisierung der Rezeptoren und des Blockierungsreagenzes finden durch Belichten bei geeigneten Wellenlängen statt.

Weitere erfindungsgemäß geeignete Blockierungsreagenzien sind die oben erwähnten Tenside mit einer photoreaktiven Gruppe am hydrophoben Terminus, beispielsweise Benzophenon-4-(Natriumpalmitat). Derivate auch anderer Tenside sind von einem Fachmann ohne weiteres schnell herstellbar. Diese Substanzen blo-

ckieren Bereiche, auf denen hydrophobe Wechselwirkungen stattfinden. Auch nichtionische/anionische Tenside mit photo-reaktiven Gruppen sind geeignet. Ein Vorteil wäre, dass man außerdem damit stabile Lipidvesikel herstellen könnte.

5

## Beispiele

### Herstellung von photoreaktiven Caseinfragmenten

Vorzugsweise wird relativ niedermolekulares Casein mit einem  
10 Molekulargewicht von < 10 kD verwendet. Dieses wird in Natrium-  
phosphatpuffer (pH-Wert 7,5) aufgelöst und mit der 20fachen  
molaren Menge an Crosslinker (5-Azido-2-nitrobenzoesäure-N-  
hydroxysuccinimidester als Stammlösung in Dimethylformamid  
bzw. DMF) im Dunkeln umgesetzt (Raumtemperatur, 2 Std.). An-  
15 schließend wird das Protein durch Auftrennen über eine Sepha-  
dex-Säule gereinigt und auf eine Konzentration von 1 %  
(Gew./Vol.) eingestellt (z.B. durch Verdünnen). Der pH-Wert  
der fertigen Lösung wird auf 7,0 eingestellt.

### 20 Aufbringen auf eine Oberfläche

Das kovalente Blocken des ggf. zuvor mit Rezeptormolekülen  
versehenen Biosensors wird folgendermaßen durchgeführt. Die  
Sensoroberfläche wird 2 Std. mit dem Blockierungspuffer bei  
4°C inkubiert und anschließend gründlich mit PBS-Puffer (PBS-  
25 Puffer ist phosphatgepufferte Kochsalzlösung) gewaschen.  
Schließlich wird mit UV-Licht (Wellenlänge ca. 300 nm) ca. 5  
Minuten belichtet. Fakultativ kann die Sensoroberfläche zu-  
sätzlich noch mit einer 0,1 %igen Gelatinelösung zur besseren  
Stabilisierung der vorhandenen Proteine benetzt bzw. besprüht  
30 werden.

Patentansprüche

1. Sensoroberfläche mit darauf kovalent immobilisierten spezifischen Sondenmolekülen für mindestens ein nachzuweisendes Biomolekül, **dadurch gekennzeichnet**, dass grundsätzlich für unspezifische Bindungen zur Verfügung stehende Stellen oder Bereiche der Sensoroberfläche durch mindestens ein kovalent daran immobilisiertes Blockierungsreagenz inaktiviert sind.
2. Sensoroberfläche nach Anspruch 1, **dadurch gekennzeichnet**, dass die Sondenmoleküle ein adressierbares Muster bilden.
3. Sensoroberfläche nach einem der vorstehenden Ansprüche, **dadurch gekennzeichnet**, dass das mindestens eine Blockierungsreagenz über mindestens einen photoreaktiven Vernetzer kovalent an der Oberfläche immobilisiert ist.
4. Sensoroberfläche nach Anspruch 3, **dadurch gekennzeichnet**, dass der mindestens eine photoreaktive Vernetzer mindestens eine unter Benzophenon oder Derivaten davon, Anthrachinon oder Derivaten davon, Thymidin oder Derivaten davon, und 4-Azidobenzoesäure oder Derivaten davon ausgewählte photoreaktive Gruppe aufweist.
5. Sensoroberfläche nach einem der vorstehenden Ansprüche, **dadurch gekennzeichnet**, dass die Sensoroberfläche unter Metall-, Halbm Metall-, Halbmetalloxid-, Glas- und Polymeroberflächen ausgewählt ist.

6. Sensoroberfläche nach Anspruch 5, **dadurch gekennzeichnet**, dass die Metalloberfläche unter Gold- und Aluminiumoberflächen ausgewählt ist.
- 5 7. Sensoroberfläche nach Anspruch 5, **dadurch gekennzeichnet**, dass die Halbmetalloberfläche eine Siliciumoberfläche ist.
8. Sensoroberfläche nach Anspruch 5, **dadurch gekennzeichnet**, dass die Halbmetalloxidoberfläche eine Siliciumoxid- oder Aluminiumoxidoberfläche ist.
- 10 9. Sensoroberfläche nach Anspruch 5, **dadurch gekennzeichnet**, dass die Glasoberfläche eine Quarzglasoberfläche ist.
- 15 10. Sensoroberfläche nach Anspruch 5, **dadurch gekennzeichnet**, dass die Polymeroberfläche unter Oberflächen aus Cycloolefincopolymer oder Derivaten davon, Polystyrol oder Derivaten davon, Polyethylen oder Derivaten davon, Polypropylen oder Derivaten davon, Polyimid oder Derivaten davon, und Polymethylmethacrylat oder Derivaten davon ausgewählt ist.
- 20 11. Sensoroberfläche nach einem der vorstehenden Ansprüche, **dadurch gekennzeichnet**, dass das Sondenmolekül ein Partner eines spezifisch wechselwirkenden Systems von komplementären Bindungspartnern (Rezeptor/Ligand) ist.
- 25 12. Sensoroberfläche nach Anspruch 11, **dadurch gekennzeichnet**, dass das spezifisch wechselwirkende System von kom-
- 30



plementären Bindungspartnern auf der Wechselwirkung einer Nukleinsäure mit einer komplementären Nukleinsäure, der Wechselwirkung einer Peptidnukleinsäure mit einer Nukleinsäure, der Enzym/Substrat-, Rezeptor/Effektor-,  
5 Lectin/Zucker-, Antikörper/Antigen-, Avidin/Biotin- oder Streptavidin/Biotin-Wechselwirkung beruht.

13. Sensoroberfläche nach Anspruch 12, **dadurch gekennzeichnet**, dass die Nukleinsäure eine DNA oder RNA oder ein  
10 Analogon davon ist.

14. Sensoroberfläche nach Anspruch 13, **dadurch gekennzeichnet**, dass die DNA oder RNA ein Oligonukleotid ist.

15 15. Sensoroberfläche nach Anspruch 12, **dadurch gekennzeichnet**, dass der Antikörper ein polyklonaler, monoklonaler, chimärer oder »Single-chain«-Antikörper oder ein funktionelles Fragment oder Derivat eines derartigen Antikörpers ist.

20

16. Sensoroberfläche nach einem der vorstehenden Ansprüche, **dadurch gekennzeichnet**, dass das Blockierungsreagenz unter Casein, hydrolysiertem Casein, einem Tensid, Rinder-  
serumalbumin, fötalem Kälberserum, Serum neugeborener  
25 Kälber, und Mischungen davon ausgewählt ist.

25

17. Sensoroberfläche nach Anspruch 16, **dadurch gekennzeichnet**, dass das Tensid unter Natriumpalmitat, Brij® 35, Brij® 58, Cetylpyridiniumchlorid-Monohydrat, Cetyltrimethylammoniumbromid, 3-(3-Cholamidopropyl)-dimethylammonio-1-propansulfonat, 3-(3-Cholamidopropyl)-dimethyl-  
30

ammonio-2-hydroxy-1-propansulfonat, Decan-1-sulfonsäure-Natriumsalz, N,N-Bis-[3-(D-gluconamido)-propyl]-deoxycholamid, Dodecan-1-sulfonsäure-Natriumsalz, Dodecyl- $\beta$ -D-maltosid, 6-O-(N-Heptylcarbamoyl)-methyl- $\alpha$ -D-glucopyranosid, Heptan-1-sulfonsäure-Natriumsalz, N-Lauroyl-sarcosin-Natriumsalz, Octanoyl-N-methylglucamid, N-Nonanoyl-N-methylglucamid, Natriumcholat, Natriumdeoxycholat, Nonan-1-sulfonsäure-Natriumsalz, Nonidet P40, Octan-1-sulfonsäure-Natriumsalz, n-Octyl- $\beta$ -D-glucopyranosid, Pentan-1-sulfonsäure-Natriumsalz, n-Octyl- $\beta$ -D-thioglu-  
copyranosid, Pluronic® F-68, Saccharosemonolaurat, Natriumdodecylsulfat, N-Dodecyl-dimethyl-3-ammonio-1-propansulfonat, N-Tetradecyl-dimethyl-3-ammonio-1-propan-sulfonat, Triton® X-100, und Mischungen davon ausgewählt ist.

18. Verfahren zum Nachweis des Vorhandenseins von Analyten in einer zu untersuchenden Probe unter Verwendung Oberflächen-gebundener Rezeptormoleküle, **dadurch gekennzeichnet**, dass eine Sensoroberfläche gemäß einem der Ansprüche 1 bis 17 verwendet wird.
19. Vorrichtung zur Verwendung in einem Verfahren gemäß Anspruch 18, **dadurch gekennzeichnet**, dass sie eine Sensoroberfläche gemäß einem der Ansprüche 1 bis 17 aufweist.
20. Kit zur Verwendung in einem Verfahren gemäß Anspruch 18, **dadurch gekennzeichnet**, dass er eine Sensoroberfläche gemäß einem der Ansprüche 1 bis 17 und gegebenenfalls Puffer und Nachweisreagenzien enthält.

21. Blockierungsreagenz, **dadurch gekennzeichnet**, dass es mindestens eine photoreaktive Gruppe zur kovalenten Immobilisierung an einer Sensoroberfläche aufweist.

5 22. Blockierungsreagenz nach Anspruch 21, **dadurch gekennzeichnet**, dass das Blockierungsreagenz unter Casein, hydrolysiertem Casein, einem Tensid, Rinderserumalbumin, fötalem Kälberserum, Serum neugeborener Kälber, und Mischungen davon ausgewählt ist.

10

23. Blockierungsreagenz nach Anspruch 22, **dadurch gekennzeichnet**, dass das Tensid unter Natriumpalmitat, Brij® 35, Brij® 58, Cetylpyridiniumchlorid-Monohydrat, Cetyltrimethylammoniumbromid, 3-(3-Cholamidopropyl)-dimethylammonio-1-propansulfonat, 3-(3-Cholamidopropyl)-dimethylammonio-2-hydroxy-1-propansulfonat, Decan-1-sulfonsäure-Natriumsalz, N,N-Bis-[3-(D-gluconamido)-propyl]-deoxycholamid, Dodecan-1-sulfonsäure-Natriumsalz, Dodecyl- $\beta$ -D-maltosid, 6-O-(N-Heptylcarbamoyl)-methyl- $\alpha$ -D-glucopyranosid, Heptan-1-sulfonsäure-Natriumsalz, N-Lauroylsarcosin-Natriumsalz, Octanoyl-N-methylglucamid, N-Nonaoyl-N-methylglucamid, Natriumcholat, Natriumdeoxycholat, Nonan-1-sulfonsäure-Natriumsalz, Nonidet P40, Octan-1-sulfonsäure-Natriumsalz, n-Octyl- $\beta$ -D-glucopyranosid, Pentan-1-sulfonsäure-Natriumsalz, n-Octyl- $\beta$ -D-thioglucopyranosid, Pluronic® F-68, Saccharosemonolaurat, Natriumdodecylsulfat, N-Dodecyl-dimethyl-3-ammonio-1-propansulfonat, N-Tetradecyl-dimethyl-3-ammonio-1-propansulfonat, Triton® X-100, und Mischungen davon ausgewählt ist.

15

20

25

30

24. Blockierungsreagenz nach einem der Ansprüche 21 bis 23, **dadurch gekennzeichnet**, dass die mindestens eine photo-reaktive Gruppe unter Benzophenon oder Derivaten davon, Anthrachinon oder Derivaten davon, Thymidin oder Deriva-  
5 ten davon, und 4-Azidobenzoessäure oder Derivaten davon ausgewählt ist.

25. Verfahren zur Herstellung eines Blockierungsreagenzes gemäß einem der Ansprüche 21 bis 24, **dadurch gekenn-  
10 zeichnet**, dass mindestens ein Blockierungsreagenz gemäß Anspruch 22 oder 23 mit mindestens einem Vernetzer umgesetzt wird, der mindestens eine photoreaktive Gruppe aufweist.

15 26. Verfahren nach Anspruch 25, **dadurch gekennzeichnet**, dass die mindestens eine photoreaktive Gruppe unter Benzophe-  
non oder Derivaten davon, Anthrachinon oder Derivaten davon, Thymidin oder Derivaten davon, und 4-Azido-  
benzoessäure oder Derivaten davon ausgewählt wird.

20 27. Kit zur Herstellung einer Sensoroberfläche gemäß einem der Ansprüche 1 bis 17, **dadurch gekennzeichnet**, dass er mindestens ein Blockierungsreagenz gemäß einem der An-  
sprüche 21 bis 24 und gegebenenfalls eine Sensoroberflä-  
25 che sowie Puffer und Reagenzien enthält.